

University of Groningen

Identification of domain interfaces in the E. coli mannitol permease

van Montfort, Bart

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

van Montfort, B. (2001). *Identification of domain interfaces in the E. coli mannitol permease*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

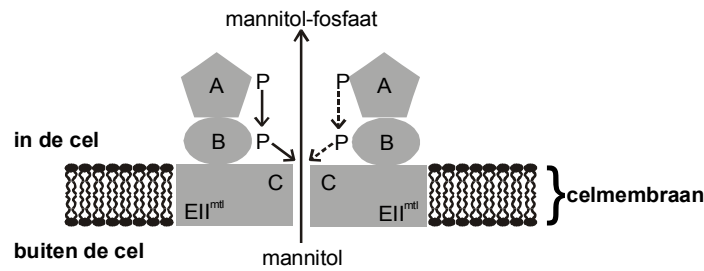
Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

Om te kunnen overleven moeten micro-organismen voedingsstoffen opnemen uit hun omgeving en afvalstoffen uitscheiden. Het inwendige van een cel is gescheiden van de omgeving door een zogenoemde celmembraan, die ondoorlatend is voor de meeste nutriënten en afvalstoffen. In deze membraan bevinden zich transporteiwitten die de opname en uitscheiding bewerkstelligen. Dit proefschrift beschrijft een onderzoek aan een membraaneiwit, dat zorgt voor de opname van het koolhydraat mannitol in de darmbacterie *Escherichia coli*. Dit eiwit wordt de mannitol transporter of mannitol-speciek enzym II, afgekort tot EII^{mtl} , genoemd (in het engels mannitol permease). Naast deze opname-activiteit heeft EII^{mtl} nog een andere functie en dat is het modifieren (veranderen) van de opgenomen mannitol, zodat het geschikt is voor de energieproductie in de cel. Deze modificatie betreft het koppelen van een fosfaatmolecuul aan mannitol en wordt fosforylering genoemd. Om deze functies uit te kunnen voeren bestaat EII^{mtl} uit drie gedeelten, die A, B en C domein genoemd worden. In figuur 1 is de domeinopbouw van EII^{mtl} schematisch weergegeven.



Figuur 1. Schematische weergave van de opbouw van de mannitol transporter (EII^{mtl}). EII^{mtl} is een dimeer en het C domein zorgt voor het contact tussen de twee eiwitten. Het fosfaat molecuul is weergegeven met de letter P.

Het B domein ontvangt een fosfaat groep van het A domein. Het C domein bevindt zich in de celmembraan en zorgt voor het transport van mannitol over de membraan. Mannitol gebonden aan de cytoplasmatische (binnenzijde) van het C domein wordt door het B domein gefosforyleerd waarna mannitol-fosfaat vrijkomt in de cel. Onderzoek in het verleden heeft aangetoond dat het transport door het C domein bijna 1000 keer sneller gaat als het B domein gefosforyleerd is. Dit betekent dat het C domein op een nog onbekende manier voelt dat het B domein gefosforyleerd is, waarvoor deze domeinen een interactie met elkaar moeten aangaan. Verder is bekend dat EII^{mtl} actief is als een dimeer, wat wil zeggen dat twee EII^{mtl} subeenheden, met elk hun eigen A, B en C domein, bij elkaar zitten en samen een functionele eenheid vormen. Het C domein zorgt voor de contacten tussen de twee EII^{mtl} subeenheden van een dimeer (figuur 1). Het is derhalve duidelijk dat interacties tussen de domeinen en subeenheden heel belangrijk zijn voor het

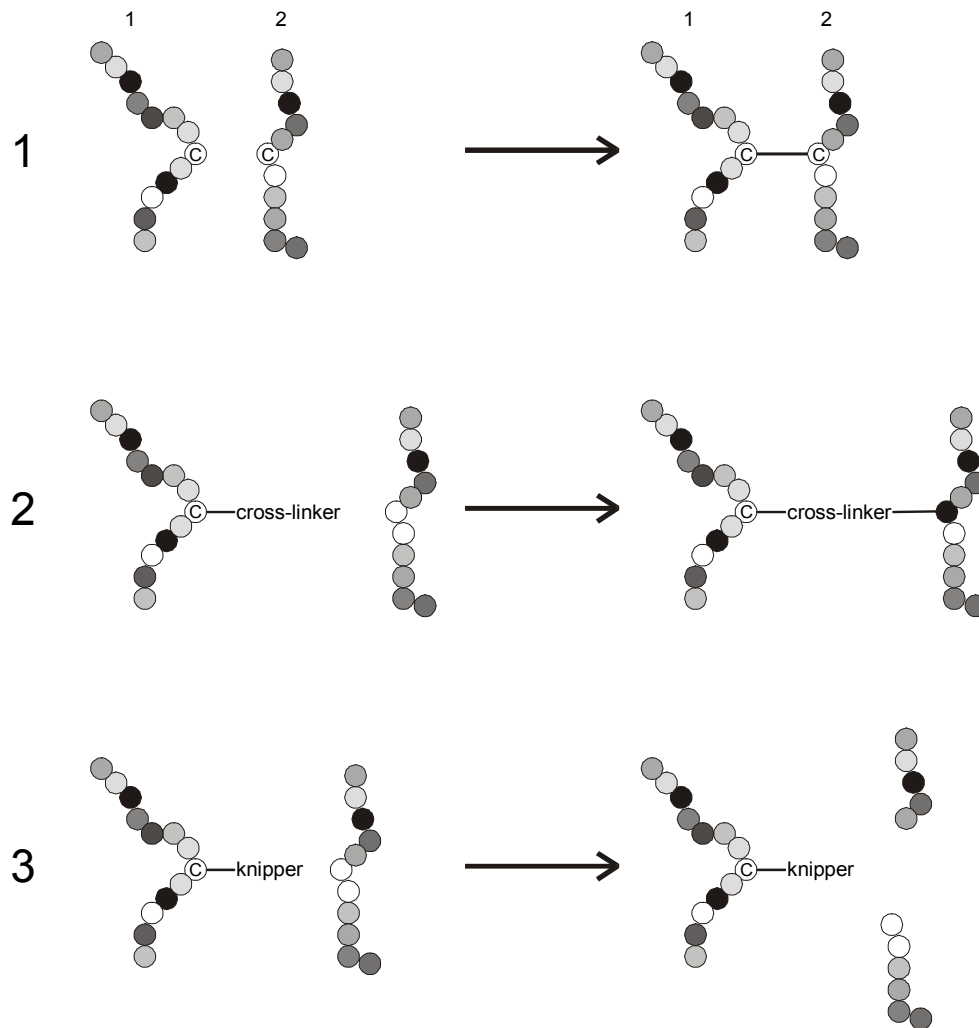
functioneren van dit membraaneiwit. Het doel van dit onderzoek is vinden en karakteriseren van de plaatsen waar de domeinen contact met elkaar hebben, de zogenoemde "interfaces", wat essentieel is om het werkingsmechanisme van dit eiwit te kunnen begrijpen. De eerste helft van hoofdstuk 1 geeft een samenvatting van onze kennis over de structuur en het werkingsmechanisme van EII^{mtl}.

Een eiwit is een keten van aminozuren die vergeleken kan worden met een kralensnoer. Elk eiwit heeft een specifieke volgorde van aminozuren die uniek is voor het betreffende eiwit. De keten vouwt zich op tot een drie dimensionale structuur die bepaald wordt door de volgorde van de aminozuren. De bepaling van de atomaire structuur van een membraaneiwit is erg moeilijk en nog niet gerealiseerd voor EII^{mtl} of eiwitten die qua functie en volgorde van de aminozuren sterk lijken op EII^{mtl}. Wel is bekend dat in EII^{mtl} de drie domeinen, die gevormd worden door één keten van 637 aminozuren, gezien kunnen worden als drie onafhankelijke eenheden. In dit proefschrift worden technieken beschreven waarmee de contactplaatsen tussen de domeinen gelokaliseerd kunnen worden. De bedoeling was om een antwoord te krijgen op de vraag welke aminozuren in verschillende domeinen dicht bij elkaar zitten. In dit proefschrift is met name gekeken naar de contactplaats tussen het B en C domein en die tussen twee C domeinen in een dimeer.

Het is mogelijk om met moleculair biologische technieken een aminozuur op een bekende plaats in de keten te vervangen door een cysteine. Meestal heeft dit geen grote gevolgen voor de drie dimensionale structuur van het eiwit. Deze cysteines kan men vervolgens laten reageren met verschillende agentia, waarmee vervolgens informatie kan worden verkregen over de contactplaatsen tussen domeinen en eiwitten. In dit proefschrift wordt gebruik gemaakt van drie verschillende methodes om de contactplaatsen te bepalen met behulp van cysteines (figuur 2).

In de eerste methode, de zogenoemde *cysteine-koppeling*, wordt gebruik gemaakt van de mogelijkheid om specifiek een verbinding te maken tussen twee cysteines. Door op twee posities, in elk domein één, een cysteine te plaatsen en vervolgens te onderzoeken of het mogelijk is om een verbinding te maken tussen deze twee cysteines, kan bepaald worden of deze cysteines in de drie dimensionale structuur bij elkaar in de buurt zitten.

De tweede methode is *plaatsgerichte-koppeling*. In deze methode word gebruikt gemaakt van een eiwit waarin maar één cysteine in één van de domeinen zit. Aan deze cysteine kan specifiek een verbinding gekoppeld worden, een zogenoemde cross-linker. Vervolgens kan deze cross-linker reageren met alle andere aminozuren, mits deze in de buurt van de cysteine zitten. Door na deze reactie te bepalen waar de cross-linker terecht is gekomen wordt informatie verkregen over de locatie van de contactplaats met het andere domein. Het voordeel van deze methode is dat je geen cysteine-paren nodig hebt zoals in de eerste methode -één cysteine op de goede positie volstaat- en dus de kans groter is dat de goede plek gevonden wordt. Het nadeel is dat je na de reactie nog moet bepalen waar de plaats in het andere domein is. Bij het bepalen van deze plaats kan gebruik gemaakt worden van de mogelijkheid



Figuur 2. Schematische weergave van de drie mogelijkheden om de contactplaatsen tussen twee domeinen te localiseren. De aminozuur keten is weergegeven als een kralensnoer. De verschillende aminozuren zijn weergegeven met verschillende grijs tinten. Het aminozuur cysteine is aangegeven met de letter C. Weergegeven is de situatie voor stukken van twee domeinen voor- (links van de pijl) en nadat de methode is gebruikt (rechts van de pijl).

om het eiwit te fragmenteren. Dit wordt gedaan met zogenoemde proteases of chemische methoden die in staat zijn om de aminozuurketen specifiek bij bepaalde aminozuren te knippen. Beide domeinen worden dan in diverse fragmenten van verschillende lengte geknipt. Door de cross-linker worden twee fragmenten, van elk domein één, aan elkaar gekoppeld. Door te bepalen welke fragmenten dat zijn wordt de contactplaats gevonden.

De derde methode om de contactplaats te bepalen, wordt *plaatsgerichte-splitsing* genoemd, en maakt gebruik van een verbinding aan een cysteine die in staat is om de keten van aminozuren in het nabijgelegen gedeelte van het andere domein te knippen. In tegenstelling tot de hierboven genoemde proteases of chemische methoden is deze knipper niet specifiek voor bepaalde aminozuren. Na de knipreactie is het andere domein gesplitst en kan die splitsingsplaats gezocht worden.

Voor methode 2 en vele andere toepassingen in de eiwitchemie is het belangrijk om een goede methode te hebben om fragmenten te kunnen maken van membraaneiwitten. Het gewicht of massa van een heel eiwit of een fragment ervan kan bepaald worden met een techniek die massa-spectrometrie heet. De tweede helft van hoofdstuk 1 introduceert massa-spectrometrie en geeft een overzicht van de recente ontwikkelingen in de technieken die het mogelijk maken om membraaneiwitten te analyseren. Het maken van fragmenten van membraaneiwitten en het bepalen van de massa ervan is echter niet eenvoudig. In hoofdstuk 3 en 4 worden methoden beschreven waarmee dit beter gaat. Deze methoden zijn ontwikkeld voor het C domein van Ell^{mt}, maar werken ook voor andere membraaneiwitten. De verbeterde methoden maken gebruik van een algemene scheidingsmethode voor eiwitten in een gel. Verschillende eiwitten worden met deze methode van elkaar gescheiden op basis van grootte, waarbij de gel werkt als een soort zeef. De fragmenten van het eiwit worden gemaakt in deze gel, nadat de scheiding heeft plaatsgevonden. Een voordeel is dat kleine hoeveelheden eiwit nodig zijn en dat gewerkt kan worden met mengsels van eiwitten. Eén van de problemen met membraaneiwitten is dat de gevormde fragmenten slecht oplossen in water. Dit heeft te maken met het feit dat de celmembraan een waterafstotend milieu vormt en dat eiwitten in die membraan veel waterafstotende aminozuren bevatten. Door gebruik te maken van zeepachtige verbindingen, die deze moeilijk oplosbare fragmenten oplossen kan de massa ervan bepaald worden. Zoals hierboven al vermeld kun je fragmenten maken van een eiwit met behulp van proteases of met chemische methoden. Voor membraaneiwitten geldt dat de hier gebruikte chemische methode vaak beter werkt. Hoofdstuk 4 laat zien dat het genereren van fragmenten nog beter gaat als het gebruik van een protease gecombineerd wordt met de chemische methode.

Een belangrijke conclusie in dit proefschrift is dat de cysteine in het B domein, waaraan het fosfaat molecuul gekoppeld wordt (nummer 384), zich bevindt in de nabijheid van cysteine 384 in het andere B domein van de dimeer. Deze cysteine 384 zit tevens in de buurt van aminozuur 124 uit het C domein. Dit is dus één van de contactplaatsen tussen het B en C domein. Bovendien bevindt aminozuur 124 uit het ene domein zich in de nabijheid van het overeenkomstige aminozuur in de andere subeenheid van de dimeer, wat dus een gedeelte van de contactplaats tussen de twee C domeinen vormt. Het is niet bekend of deze vier cysteines gelijktijdig bij elkaar zitten of dat bijvoorbeeld tweetallen gevormd worden, afhankelijk van de toestand van het eiwit, dat wil zeggen al dan niet gefosforyleerd op het B domein dan wel dat mannitol gebonden is. Het belangrijkste bewijs voor de domein contactplaatsen

wordt geleverd in hoofdstuk 5, waar gebruik is gemaakt van methode 1. In hoofdstuk 2 wordt eveneens bewijs geleverd voor het bij elkaar gelegen zijn van de cysteine op positie 384 in het B domein en een locatie in het C domein. In dit hoofdstuk is gebruik gemaakt van de plaatsgerichte-koppelingsmethode. Dat beide aminozuren op positie 124 in een dimeer dicht bij elkaar liggen wordt tevens aangetoond in hoofdstuk 6, waar ook gebruik gemaakt wordt van methode 1, maar dan in een C domein, waar geen A en B domein aan vast zit. Een groot aantal locaties in het C domein zijn getest op hun potentie om een verbinding aan te gaan met dezelfde cysteine maar dan in het andere C domein. Een aantal van deze posities, waaronder aminozuur 124, blijken dat inderdaad te kunnen en op basis van deze resultaten is een model gepostuleerd voor de contactplaats tussen twee C domeinen.

Hoofdstuk 7 beschrijft de aanpak waarbij gebruik wordt gemaakt van de derde methode om aan te tonen dat bepaalde aminozuren zich op de contactplaats bevinden. Het is belangrijk dat de gebruikte knipper maar op één plaats in het eiwit zit, omdat het anders niet mogelijk is om te bepalen welke knipplaats bij welke cysteine hoort. Als deze knipper namelijk op meerdere plaatsen in het ene domein zit en er in het andere domein een knip wordt gemaakt is niet duidelijk door welke knipper dit gedaan is en dus ook niet vanaf welke positie in het eerste domein. Dit betekent dus eigenlijk dat er maar één cysteine in het eiwit mag zitten, wat ook voor methode 2 geldt. Het maken van verschillende EII^{mtl}'s met maar één cysteine is niet mogelijk, omdat de plaats waaraan het fosfaat molecuul gekoppeld wordt in het B domein de cysteine op positie 384 is. Als die verwijderd wordt, functioneert EII^{mtl} niet meer. Het maximaal haalbare is een eiwit met slechts twee cysteines: één op de gewenste positie en één op positie 384. In hoofdstuk 7 wordt een methode beschreven om specifiek de cysteine in het B domein te beschermen. Dit is bereikt door een fosfaatmolecuul aan de cysteine in het B domein te koppelen. De eerste resultaten van deze aanpak zouden geïnterpreteerd kunnen worden als een aanwijzing dat de cysteine in het B domein zich in de buurt bevindt van het andere B domein in de dimeer.

Vooruitzichten

In dit proefschrift is een begin gemaakt met het bepalen van combinaties van aminozuren die dicht bij elkaar zitten in de drie dimensionale structuur van EII^{mtl}. Door het opsporen van meerdere combinaties, zou uiteindelijk de structuur nagenoeg helemaal bepaald kunnen worden. Met een beperkt aantal combinaties is het echter al mogelijk om meerdere contactplaatsen, zoals die hier zijn gevonden, te lokaliseren. Dergelijk onderzoek kan ook nog informatie opleveren over veranderingen in de drie dimensionale structuur van het eiwit als gevolg van mannitol binding of fosforylering van het B domein.

De resultaten in hoofdstuk 5 suggereren de mogelijkheid dat EII^{mtl} niet alleen aanwezig is als een dimeer, maar ook als tetrameer. Een tetrameer bestaat uit vier EII^{mtl} eiwitten. Dit is een interessante waarneming en kan nieuwe inzichten opleveren

in de structuur en het functioneren van dit membraaneiwit. Meer onderzoek is nodig om dit te bevestigen.